

文章编号: 1001-411X(2002)03-0071-03

伪狂犬病毒粤 A 毒株 TK 基因的扩增、克隆与序列测定

吴德铭, 罗满林, 黄毓茂, 刘镇明, 鄢苏晓

(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 以华南农业大学兽医学院传染病教研室分离的伪狂犬病毒粤 A 毒株(PRVYA)的基因组为模板, 利用聚合酶链反应(PCR)扩增 TK 基因, 获得预定大小的片段, 将这一片段克隆到 PMD18-T 载体中. 对重组质粒 PMD18-TK 进行 PCR 鉴定、限制性内切酶分析和克隆片段的序列测定、比较, 证实了克隆片段的可靠性.

关键词: 伪狂犬病毒; 粤 A 毒株; 聚合酶链反应; TK 基因; PMD18-T 载体

中图分类号: Q784; S852.6591

文献标识码: A

伪狂犬病毒(PRV)属于疱疹病毒科 α -病毒亚科, 可以引起多种动物的亚临床和临床感染. 猪是本病毒的唯一自然宿主, 受其危害大, 怀孕母猪可发生流产、死胎、弱胎、木乃伊胎; 新生仔猪可发生急性死亡, 伴以神经症状为特征. PR 病毒是由一封闭的核衣壳以及环于其中的约 145 kb 的线性 DNA 组成, 编码 72~100 种蛋白质, 病毒的某些基因编码的蛋白为非结构蛋白, 对病毒的复制是非必需的, 在弄清这些基因序列的基础上, 可以进行相关的分子生物学研究^[1,2]. TK 基因是伪狂犬病毒的主要毒力基因之一, 它与病毒在机体中的潜伏感染和在神经组织中的增殖有关, 但又是病毒增殖的非必需基因^[3,4]. 目前, 伪狂犬病疫苗大多缺失了 TK 基因^[5,6], 为了有效的鉴别抗体是由疫苗毒诱导产生的还是因为感染野毒所导致的, 急需建立一种快速、简便的诊断方法, 为此笔者克隆、测序了华南农业大学兽医学院传染病教研室在广东某猪场分离的伪狂犬病毒粤 A 毒株 TK 基因(PRVYA-TK).

1 材料与方法

1.1 细胞、质粒、工程菌和病毒

HS-2H 细胞由广州出入境检疫局惠赠; PMD18-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司; 工程菌 DH₅ 由华南农业大学兽医学院传染病教研室保存; 伪狂犬病毒粤 A 毒株由华南农业大学兽医学院传染病教研室分离并保存.

1.2 试剂与工具酶

细胞基础培养基 DMEM 购自 Gibco BRL 公司; 新生小牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所; L-Glutamine 购自华美生物工程公司.

核酸内切酶 *Hind* III、*Bam*H I、*Eco*R I 购自宝生物工程(大连)有限公司; RNA 酶、T4DNA Ligase、200 bp Ladder DNA Marker、 λ DNA/*Eco*R I + *Hind* III DNA Marker 购自华美生物工程公司; *Taq* DNA 聚合酶和 dNTPs 均为加拿大真达公司产品; UNIQ-5 柱离心式 DNA 胶回收试剂盒购自上海生物工程技术服务有限公司.

1.3 病毒基因组的提取

取适量 PRVYA 种毒接种生长良好的 HS-2H 细胞, 待细胞出现 90% CPE 时, 收获病毒液. 将收获的病毒液反复冻融 3 次, 10 000 r/min 30 s, 弃上清, 用 TE 溶液重悬沉淀, 转移至 1.5 mL 离心管, 同上离心、弃上清, 往沉淀中加入 600 μ L 细胞裂解液, 混匀; 置 37 $^{\circ}$ C 水浴作用 30 min, 10 000 r/min 10 min, 转移上清至新的 1.5 mL 离心管, 分别加入等量 Tris-HCl 饱和酚、氯仿:异戊醇(*V*:*V*=24:1)各抽提 1 次, 吸取上清至另一新管, 加入 2 倍体积冷无水乙醇, 转动、混匀液体, 见絮状物, 用带钩玻棒转移至新管, 再用 φ =70% 的乙醇洗涤 2 次, 风干, 加适量 TE 溶液或灭菌双蒸水溶解, -20 $^{\circ}$ C 保存^[7].

1.4 引物设计与 PCR 扩增

根据 NIA-3 株的 TK 基因序列, 同时按参考文献^[2]设计了一对引物, 由上海生物工程技术服务有限公司合成. 以所抽提的病毒基因组为模板, 进行扩增, 反应体系如下^[5]: 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ L, dNTP 混合物(2 mmol/L)5 μ L, 二甲基亚砜 5 μ L, 引物 1 和引物 2 各 2.5 μ L, 模板 0.5 μ L, *Taq* 酶(2.5 U)0.5 μ L, 加灭菌双蒸水至 50 μ L. 反应条件: 变性、退火和延伸温度分别为 94、58 和 72 $^{\circ}$ C; 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 第一循环的变性、退火和延伸时间分别为 50、90 和 180 s, 2 个

收稿日期: 2002-01-10

作者简介: 吴德铭(1977-), 男, 在读硕士研究生. 通讯作者: 刘镇明(1946-), 男, 副教授

基金项目: 广东省科技攻关课题(ZKM03507N); 国家自然科学基金项目(39770033).

1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

循环, 后续循环为 50、60 和 120 s, 33 个循环; 循环完毕后, 延伸 10 min.

1.5 PRVYA—TK 基因的克隆

将 PCR 扩增获得的 DNA 片段, 用 UNIQ—5 柱离心式 DNA 胶回收试剂盒回收目的条带, 将回收的目的片段与 PMD18—T 载体连接, 16℃作用 2 h、4℃过夜; 次日, 用已制备好的感受态细胞进行转化: 取连接产物 10 μL, 加入 100 μL 感受态细胞中, 混匀, 置冰浴中 30 min, 转入 42℃水浴 90 s, 迅速移入冰浴中 2 min, 然后加入预热的 LB 培养基 800 μL, 混匀, 37℃160 r/min 振摇 45 min, 取 400 μL 菌液均匀涂布含 X—gal、IPTG 和 Amp (50 mg/L) 的 LB 琼脂平板, 37℃培养 12—16 h^[8]. 翌日, 挑取白色菌落接种 3 mL 加有 Amp LB 培养液, 37℃振摇过夜, 菌落 PCR 扩增鉴定, 再进一步提取 PCR 阳性菌落的质粒, 酶切鉴定.

1.6 克隆片段的测序

将经过初步鉴定的重组质粒送上海博亚生物技术有限公司进行序列测定.

```
YA  GGGCACGGCAAAC TTTATTGGGATGACATACACATGGCTTTATACGCGCCCCGAGCCCCC
FS  .....CG.....

YA  TCCCACGCCGTCGTCGTTGCCTCCGTCGCGGTCTTCATCCGGCCGCGGCGCGGGTGGGAG
FS  .....C.....

YA  GGGCGAGGGTCACACCCCCATCTCCGACGTGAAGGCGCACACGCACTGCCGGATGTGGTC
FS  .....

YA  GCCGTACGCGGACTCCGTCACCTCCATGCCGCGCGCCTGCGCCGCCACGGCCGCGGCGCA
FS  .....T.....

YA  GACGCGCGGCGAGGGCCCCAGGTCGACGGTGGAGACGCGCAGCGGCAGCAGCTTGGCCAC
FS  .....

YA  GAGCGCGTCCATCGCCACGCGTGCACCTCGAGCGGGCGCCCCGCGCCGGTCGCAGAGCTC
FS  .....

YA  GGGCGCCTTGTACGCGCCGAAGAGGGTGTCTTGAGCTCGGGGTCGTCGCGCGGGCGGCA
FS  .....A.....

YA  GAGTCGTTGAGCGCGAGGCAGTCGCGCACGGTCTGGTCTGAAGCGCGGCGCGCGCCCCCA
FS  .....C.....GT.....

YA  GTCGTCGCGCCAGCGGCGCCCCGTGCTCAGGTAGCGCGACGTGTTGACCAGCATGGCGTA
FS  .....A.....

YA  GACGT
FS  .....
```

3 讨论

3.1 试验中发现个别 PCR 阳性重组质粒, 用相应的限制性内切酶无法切动; 换用另一阳性重组质粒, 无此种现象出现. 这说明, 可能个别 PCR 阳性重组质

2 结果

2.1 TK 基因片段的扩增

以抽提的病毒基因组为模板, 利用合成的引物进行 PCR 扩增, 可以获得 1 条大小约为 1.5 kb 的特异性条带, 与预计产物的长度 (1 565 bp) 相符合.

2.2 重组质粒 PMD18—TK 的鉴定

以重组质粒为模板, 进行 PCR 鉴定, 可得到 1 条约 1.5 kb 的特异条带; 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切重组质粒, 在 80 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 可见有大小约为 2.6 kb 和 1.5 kb 的 2 条亮带; 用 *Hind* III 单酶切重组质粒, 可见一条约 4.1 kb 的条带.

2.3 克隆片段的部分序列测定与比较

将重组质粒的 TK 基因 (YA) 部分序列通过国际互联网与 PRV FS166 株 (FS) 进行比较, 结果如下, 虚线处为两毒株碱基相同, 字体加黑者为两毒株间碱基相异:

粒在转化的过程中, 其碱基的一部分已经被甲基化, 因此即便使用能够识别、切断该序列的限制酶, 也几乎无法切断被甲基化的部分.

3.2 将以上 2 个毒株的序列进行比较, 发现 PRV YA 株和 PRV FS166 株的 TK 基因的同源性很高, 达

98%;同时,也比较了 PRV YA 株和 PRV HB 株的 TK 基因,同源性也高达 98%。PRV FS166 株为美国佛罗里达州分离株,PRV YA 株分离自中国广东省,PRV HB 株为中国湖北省分离株,这说明 PRV TK 基因有着高度的保守性。因此,如果使用其中的一个毒株来构建 PRV TK 鉴别诊断试剂盒,就可以适用于不同地区或国家伪狂犬病监测的需要,而无须使用多个毒株。

参考文献:

[1] 斯特劳 B E,阿莱尔 S D,蒙加林 W L,等. 猪病学[M] . 第 8 版. 赵德明,张中秋,沈建忠,等译. 北京:中国农业大学出版社,2000. 239—253.

[2] 方六荣,周复春,陈焕春,等. 伪狂犬病病毒鄂 A 株 TK —/LacZ⁺突变株的构建[J] . 畜牧兽医学报,2001, 32 (3): 244—248.

[3] 仇华吉,童光志,周彦春,等. 通用伪狂犬病毒转移载体的构建[J] . 中国预防兽医学报,2000, 22(增刊): 1—5.

[4] 周复春,陈焕春,方云荣,等. 伪狂犬病病毒鄂 A 株 TK 基因的克隆及其鉴定[J] . 中国兽医学报,1999, 19(5): 417—420.

[5] KATZ J B, PEDERSEN J C. Molecular analysis of pseudorabies viral vaccines and their rapid differentiation from wild-type isolates using DNA—amplified glycoprotein I and thymidine kinase gene segment polymorphisms[J] . Biologicals, 1992, 20(3): 187—195.

[6] KIT S, SHEPPARD M, ICHIMURa H, et al. Second-generation pseudorabies virus vaccine with deletions in thymidine kinase and glycoprotein genes[J] . Am J Vet Res, 1987, 48 (5): 780—793.

[7] 罗满林,丁建华,刘镇明,等. 伪狂犬病毒基因转移载体的快速构建及瞬时表达[J] . 华南农业大学学报,2000, 21(2): 79~81.

[8] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M] . 第 2 版. 金冬雁,黎孟枫,等译. 北京:科学出版社,1992. 53—54.

Amplification, Cloning and Sequencing of a Fragment of TK Gene of Pseudorabies Virus

WU De-ming, LUO Man-lin, HUANG Yu-mao, LIU Zhen-ming, WU Su-xiao
(College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Using the genome DNA of the strain YA of pseudorabies virus (PRVYA) as template and with flanking primers, the TK gene fragment was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The expected size of the fragment was obtained, and it was then cloned into the PMD18—T vector. The recombinant plasmid PMD18—TK was identified by PCR, restriction enzyme analysis and sequencing, which completely proved its validity.

Key words: pseudorabies virus (PRV); YA strain; PCR; TK gene fragment; PMD18—T vector

[责任编辑 柴 焰]